

高親和性カルニチントランスポーターの機能特性と 薬物誘導型毒性発症機構との関連

著者	玉井 郁己
著者別表示	Tamai Ikumi
雑誌名	平成12(2000)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	1999-2000
ページ	11p.
発行年	2001-03
URL	http://doi.org/10.24517/00049469



KAKEN

2000

20

金 沢 大 学

高親和性カルニチントランスポーターの機能特性と 薬物誘導型毒性発症機構との関連

(課題番号 11672212)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金
基盤研究(C)(2)研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 玉 井 郁 巳
(金沢大学大学院自然科学研究科)



8000-96447-3

K1117
57

高親和性カルニチントランスポーターの機能特性と 薬物誘導型毒性発症機構との関連

(課題番号 11672212)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金
基盤研究(C) (2) 研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 玉 井 郁 巳
(金沢大学大学院自然科学研究科)

平成 11 年度～平成 12 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

課題番号 11672212

研究課題 高親和性カルニチントランスポーターの機能特性と薬物誘導型毒性発症機構との関連

研究組織 研究代表者 :
玉井郁巳 (金沢大学大学院自然科学研究科 助教授)

研究分担者 :
辻 彰 (金沢大学薬学部 教授)

研究経費	平成 11 年度	4,100 千円
	平成 12 年度	1,400 千円
	計	5,500 千円

はじめに

カルニチンは生体内脂肪酸代謝に必須な水溶性低分子物質であり、その組織移行は細胞膜トランスポーターに大きく依存している。生体内カルニチン量の低下に伴うカルニチン欠乏症は、最終的には心機能異常など致死的症状を示す病態である全身性カルニチン欠乏症の原因となり、また臨床的な薬物投与による同様の症状発症が二次性カルニチン欠乏症と呼ばれ薬物副作用として問題となる。

本研究代表者らは既に有機カチオン／カルニチントランスポーターとして分類される OCTN2 の遺伝子クローニング、機能特性解析や本トランスポーターの遺伝子変異ならびに機能／活性変動とカルニチン欠損症状 Phenotype との関連研究を通して、OCTN2 が全身性カルニチン欠乏症原因遺伝子であることを明らかにした。本研究成果はその後、世界的な全身性カルニチン欠乏症患者について OCTN2 遺伝子解析に発展し、多くの患者について多種にわたる OCTN2 遺伝子異常が見出され、それが原因となっていることが見出されるに至っている。従って、OCTN2 遺伝子の発見と基本的機能解析結果は、全身性カルニチン欠乏症の遺伝子診断をある程度可能にしたという点で重要な発見となった。

しかし、本トランスポーターの機能特性の詳細、カルニチン欠乏症に至る上でいずれの組織において重要であるか、あるいは二次性カルニチン欠乏症との関連などが未だ不明である。また、全身性カルニチン欠乏症モデル動物である juvenile visceral steatosis (jvs) マウスにおいて、OCTN2 遺伝子変異に伴う活性低下が確認されたが、一部カルニチン輸送活性が残存している可能性もあり、OCTN2 以外のカルニチントランスポーターファミリーの同定と機能・生理的役割を明らかにする必要がある。さらに、OCTN2 が有する有機カチオン輸送活性についてもその機能特性や有機カチオンの体内動態における重要性も未知である。即ち、カルニチン／有機カチオントランスポーター OCTN ファミリーの生理的・薬物動態的な意味は未知な点が多いため、より詳細な解析が必要であると。

そこで本研究では、薬物誘導型カルニチン欠乏症における OCTN2 の寄与の可能性、腎・肝を中心とした臓器における OCTN2 の役割、さらに OCTN ファミリーに属するヒト OCTN1 ならびにマウスのファミリーメンバーの基本的機能解析、さらに有機カチオン輸送や薬物による OCTN2 機能変動について解析を行うことにより、OCTN トランスポーターの生理的・薬物動態的役割についてより詳細な解析を行うことを目的とした。

本研究によって得られた成果は以下のようにまとめられる。

- 1) jvs マウスならびにヒト肝がん由来培養細胞を用いた結果、OCTN2 が肝臓へのカルニチンおよびその前駆体とである γ -ブチロベタインの取り込みに働いていることを明らかにできた。肝臓はカルニチンの生合成に働く主要な臓器であるが、OCTN2 遺伝子欠損が肝臓へのカルニチン取り込みを大きく低下させたことや γ -ブチロベタインがカルニチンと同様に OCTN2 を介して輸送される可能性が高いことから、肝臓においても OCTN2 が重要であることは十分推測される結果となった。
- 2) 日本人のマススクリーニングを行った結果、OCTN2 遺伝子に数種の変異が見出された。Heterologous な変異アリルを有する確率は 4 万人に一人程度の可

能性が示唆され、遺伝病としてかなり高頻度な可能性を有することが示された。Heterologous に変異アリルを有する場合は体内カルニチン濃度が正常値に比べ半減することから、致死的ではないにしても慢性的な心疾患の誘発を示唆するものである。即ち、多因子疾患として他の遺伝的・環境的因子との相加・相乗的作用により何らかの病状発生の頻度を高める可能性があり、予防医学的にも意味があるものと推測される結果を得ることができた。

- 3) ヒト OCTN1 ならびに OCTN2 のカルニチンならびに薬物輸送との関連を検討したところ、有機カチオン性薬物輸送活性を有していることが見出された。一方、カルニチン輸送に対して多くの薬物などが阻害活性を示すことも見出された。数種の薬物については二次性カルニチン欠乏症を生じることが知られており、それら薬物の中に OCTN2 を介したカルニチン輸送阻害作用を有することが示された。従って、二次性カルニチン欠乏症の一原因として、OCTN2 によるカルニチン輸送に対する阻害が関与していることが示唆された。
- 4) ヒト OCTN1 ならびに OCTN2 は上述したように有機カチオン輸送活性を有していた。臨床的に使用される薬物も輸送されることから、本活性が一部カチオン性薬物の体内動態に関与しているものと推測された。OCTN2 については、カルニチン輸送がナトリウムイオン依存的であるが、有機カチオンの一種であるテトラエチルアンモニウム(TEA)輸送はナトリウムイオン非依存的であった。即ち、腎臓においてはカルニチンはナトリウムイオンを駆動力とした再吸収に OCTN2 が働くが、有機カチオン輸送にとっては、尿細管分泌機構としての関与が示唆された。そこで jvs マウスを用いた TEA の体内動態解析を行ったところ、尿細管分泌の半分程度が OCTN2 を介していることが示唆された。現在、腎尿細管上皮細胞管腔側細胞膜トランスポーターの実体は不明であり、OCTN2 は初めて管腔側有機カチオントランスポーターの分子の実体として示されたものである。また、マウス OCTN2 を用いた解析では、有機カチオン輸送とカルニチン輸送が相互に trans-stimulation 効果を示すものであった。さらに、本結果は、一つのトランスポーター分子が基質によって異なるメカニズムで部室輸送に働くことを示している。生体必須物質はナトリウムイオン依存的な再吸収、異物はナトリウムイオン非依存的な排泄に働くことを示しており、合目的で効率的なトランスポーターとして位置づけられる。
- 5) マウスにおける OCTN トランスポーターファミリーの検索を行ったところ、OCTN1,3 という二種とトランスポーターの存在を新たに見出すことができた。マウス OCTN1 は非常に低いカルニチン輸送活性しか持たないが、OCTN2 と OCTN3 はカルニチン輸送活性を十分に有していた。しかし、OCTN3 のカルニチン輸送はナトリウムイオン非依存的であり、OCTN2 とは異なるメカニズムであることが示された。OCTN3 の組織分布性は精巣に高いという特性を有していた。さらに、OCTN1 や OCTN2 が有機カチオン性物質輸送活性を有しているにもかかわらず、OCTN3 はそのような活性を示さず、極めてカルニチン特性の高いものであった。以上の結果よりマウスにおけるカルニチン代謝には、現在までヒトではその存在が不明な OCTN3 が重要な役割を分担しているものと推測された。

本研究成果は以上のように新たな OCTN トランスポーターの生理的意義ならびにビタミンの一つであるカルニチンの生理的役割を理解する上で極めて重要な知見を与えるものとなった。これらの知見が今後のカルニチンならびにカルニチン欠乏症の治療に有用であるものと期待される。さらに、有機カチオン性異物輸送にも一部の OCTN トランスポーターが関与することから、カルニチン輸送にとどまらず、薬物・生体内代謝産物などの処理における OCTN トランスポーターの寄与を示すものとなった。今後は、多角的な視野での OCTN の機能・組織分布等に関するさらなる解析が必要である。

本科学研究費によって上述の研究を展開できたことに感謝申し上げます。また、以上の成果を、発表を行った学術論文・学会発表を用いて以下に示した。

平成 13 年 3 月
金沢大学大学院
自然科学研究科
助教授
玉井郁巳

研究発表

学会誌（総説を含む）

- 1) Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional and pH-dependent transport of organic cations.
Yabuuchi, H., Tamai, I., Nezu, J., Sakamoto, K., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y. and Tsuji, A.,
J. Pharmacol. Exp. Ther., **289**, 768-773 (1999).
- 2) Characteristics of L-carnitine transport in cultured hepatoma HLF cells from man.
Yokogawa, K., Miya, K., Tamai, I., Higashi, Y., Nomura, M., Miyamoto, K. and Tsuji, A.
J. Pharm. Pharmacol., **51**, 935-940 (1999).
- 3) Loss of wild-type carrier-mediated L-carnitine transport activity in hepatocytes of juvenile visceral steatosis mice.
Yokogawa, K., Yonekawa, M., Tamai, I., Ohashi, R., Tatsumi, Y., Higashi, Y., Nomura, M., Hashimoto, N., Nikaido, H., Hayakawa, J., Nezu, J., Oku, A., Shimane, M., Miyamoto, K. and Tsuji, A.
Hepatology, **30**, 997-1001 (1999).
- 4) Na⁺-dependent carnitine transport by OCTN2 and its pharmacological and toxicological relevance.
Ohashi, R., Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M. and Tsuji, A.
J. Pharmacol. Exp. Ther., **291**, 778-784 (1999).
- 4) Genetic epidemiology on carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotype characterizations in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency.
Koizumi, A., Nozaki, J., Ohura, T., Kayo, T., Wada, Y., Nezu, J., Ohashi, R., Tamai, I., Shoji, Y., Takada, G., Kiriba, S., Matsuishi, T. and Tsuji, A.,
Hum. Mol. Genet. **8**, 2247-2254 (1999).
- 5) カルニチントランスポーターOCTN2－生理的役割とその機能的多様性－
辻 彰、玉井郁巳、根津淳一、
生体の科学、**50**,285-290(1999).
- 6) Two novel missense mutations of the OCTN2 gene (W283R and V446F) in a patient with primary systemic carnitine deficiency.

Mayatepek, E., Nezu, J., Tamai, I., Oku, A., Katsura, M., Shimane, M and Tsuji, A.,
Hum. Mutat. (Online) **15**, 118 (2000).

- 7) Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice.

Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Sai, Y., Kobayashi, D., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A.
J. Biol. Chem., **275**, 40064-40072 (2000).

- 8) OCTN トランスポーターファミリーの組織分布・輸送機能の多様性,
玉井郁巳、大橋力也、根津惇一、奥飛鳥、嶋根みゆき、崔 吉道、辻 彰
薬物動態、**15**, 182-188 (2000).

- 9) Molecular and Physiological Evidence for Multifunctionality of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN2.

Ohashi, R., Tamai, I., Nezu, J., Nikaido, H., Hashimoto, N., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M., Tsuji, A.
Mol. Pharmacol. **59**(2), in press (2001).

学会発表

講演

- 1) 玉井郁巳、日本薬学会第 121 年会シンポジウム、薬物輸送・排泄の分子機構、“吸収・排泄型トランスポーター群の分子認識・輸送の多様性と遺伝子多型”、札幌、2001 年 3 月 28-30 日。
- 2) 玉井郁巳、辻 彰、日本農芸化学学会大会シンポジウム、“カルニチン／有機カチオントランスポーターOCTN ファミリーの多機能性と基質多選択性”、京都、2001 年 3 月 25 日。
- 3) 玉井郁巳、辻 彰、第 74 回日本薬理学会年会シンポジウム、血液脳関門における輸送機構と脳へのドラッグデリバリー、“血液脳関門排出輸送系による薬物の中枢性副作用回避”、横浜、2001 年 3 月 21-23 日。
- 4) 玉井郁巳、辻 彰、第 48 回日本化学療法学会西日本支部総会シンポジウム“排出タンパク質による薬剤耐性”、京都、2000 年 12 月。
- 5) 玉井郁巳、崔 吉道、辻 彰、創剤フォーラム第 6 回若手研究会、“トランスポーター機能を利用したドラッグデリバリー”、石川県辰口町、2000 年、10 月 21 日。
- 6) 玉井郁巳、崔 吉道、辻 彰、第 16 回日本 DDS 学会ワークショップ、“ペプチドトランスポーターを利用した腫瘍への薬物デリバリー” 秋田、2000 年 7 月。
- 7) Tamai, I. and Tsuji, A., International Conference on Drug-Drug Interactions, “Transporter-mediated drug interaction”, Baltimore, USA, June 2000.
- 8) 辻 彰、玉井郁巳、第 27 回日本トキシコロジー学会、“血液脳関門トランスポーターと中枢毒性” 横浜、2000 年 6 月。
- 9) 玉井郁巳、平成 12 年度国公立大学病院医療技術関係職員研修会、“トランスポーターが関与する薬物動態と病態”、東京、2000 年 5 月。
- 10) Tamai, I. and Tsuji, A., The 8TH Southeast Asia-Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists, “Transporter-mediated Drug Delivery” Taipei, Taiwan, November 1999.
- 11) 辻 彰、玉井郁巳、第 42 回日本神経化学会ワークショップ、“血液脳関門におけるトランスポーター介在薬物輸送”、広島、1999 年 9 月。

学会発表

- 1) 小林大祐、崔 吉道、根津淳一、嶋根みゆき、玉井郁巳、辻 彰、カルニチン／有機カチオントランスポーターOCTN2 タンパク質発現の免疫化学的解析、日本薬学会第 121 年会、2001、3、札幌。
- 2) 玉井郁巳、崔 吉道、根津淳一、奥飛鳥、嶋根みゆき、小泉昭夫、辻 彰、薬物トランスポーター群の遺伝子多型、第 15 回日本薬物動態学会年会、2000、10、福岡。
- 3) 大成亜希、木戸康人、加々美徹、崔 吉道、二階堂浩子、橋本憲佳、浅野雅秀、玉井郁巳、辻 彰、血液脳関門におけるカルニチン／有機カチオントランスポーターOCTN2 の機能発現、第 15 回日本薬物動態学会年会、2000、10、福岡。
- 4) 知名香代子、根津淳一、崔 吉道、奥飛鳥、嶋根みゆき、玉井郁巳、辻 彰、カルニチン／有機カチオントランスポーターOCTN2 の機能特性、第 15 回日本薬物動態学会年会、2000、10、福岡。
- 5) 崔 吉道、鍋谷華代、成橋和正、玉井郁巳、辻 彰、小腸上皮カルニチン輸送機構とその OCTN トランスポーターとの関連、第 15 回日本薬物動態学会年会、2000、10、福岡。
- 6) Ohnari, A., Tamai, I., Kido, Y., Uchino, H., Sai, Y., Nezu, J., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A., Expression and functional analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN family at the blood-brain barrier. The Millennial World Congress of Pharmaceutical Sciences, San Francisco, USA, April, 16-20, 2000.
- 7) China, K., Tamai, I., Nakanishi, T., Sai, Y., Nezu, J., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A., Establishment and transport function of cell line stably expressing carnitine/organic cation transporter OCTNs. The Millennial World Congress of Pharmaceutical Sciences, San Francisco, USA, April, 16-20, 2000.
- 8) 知名香代子、玉井郁巳、中西猛夫、崔 吉道、根津淳一、奥 飛鳥、嶋根みゆき、辻 彰、カルニチン／有機カチオントランスポーターOCTN2 安定発現株の樹立と機能解析、日本薬学会第 12 年会、2000、3、岐阜。
- 9) 大成亜希、玉井郁巳、木戸康人、島 雄一郎、内野裕史、崔 吉道、根津淳一、奥 飛鳥、嶋根みゆき、辻 彰、血液脳関門におけるカルニチン／有機カチオントランスポーターOCTN ファミリーの発現、日本薬学会第 12 年会、2000、3、岐阜。
- 10) 山口佳一、崔 吉道、玉井郁巳、辻 彰、橋本憲佳、二階堂浩子、jvs マウスを用いた有機カチオン性物質の体内動態変動解析、日本薬学会第 12 年会、

2000, 3, 岐阜。

- 11) 桂 真基, 大橋力也, 根津淳一, 奥 飛鳥, 嶋根みゆき, 崔 吉道, 玉井 郁巳, 辻 彰, 遺伝子変異体の機能変動に基づいたヒト OCTN2 トランスポーターの活性発現機構の解析, 日本薬学会第 12 年会, 2000, 3, 岐阜。
- 12) 大橋力也, 根津淳一, 崔 吉道, 奥 飛鳥, 嶋根みゆき, 玉井郁巳, 辻 彰, OCTN2 トランスポーターはカルニチン/有機カチオン交換輸送系として機能するか?, 第 14 回日本薬物動態学会, 1999, 11, 浜松。
- 13) 玉井郁巳, 大橋力也, 桂 真基, 坂本一樹, 知名香代子, 山口佳一, 根津淳一, 奥 飛鳥, 嶋根みゆき, 崔 吉道, 辻 彰, OCTN トランスポーターファミリーの組織分布・輸送機能の多様性, 第 14 回日本薬物動態学会, 1999, 11, 浜松。
- 14) 桂 真基, 大橋力也, 根津淳一, 崔 吉道, 奥 飛鳥, 嶋根みゆき, 玉井郁巳, 辻 彰, 遺伝子変異体の輸送活性変動に基づいたヒト OCTN2 トランスポーターの多機能性解析, 第 14 回日本薬物動態学会, 1999, 11, 浜松。
- 15) 玉井郁巳, 大橋力也, 崔 吉道, 辻 彰, 根津淳一, 奥 飛鳥, 嶋根みゆき, 小泉昭夫, OCTN2 トランスポーターの遺伝的機能変動に起因する全身性カルニチン欠乏症, 第 4 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会, 1999, 8, 名古屋。
- 16) Tamai, I., Ohashi, R., Sakamoto, K., Nezu, J., Oku, A., Yabuuchi, H., Sai, Y., Shimane, M., Tsuji, A., Multifunctional OCTNs mediate organic cation and Na⁺-dependent carnitine transport. 26th Meetings of the Federation of European Biochemical Societies. June 19-24 (1999). Nice, France.
- 17) Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, H., Sakamoto, K., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M., Tsuji, A., Molecular and functional characterization of carnitine transporter family, OCTNs. Experimental Biology '99, April 17-21 (1999). Washington, D.C., USA.